

Dr hab. Krystyna Winiarczyk
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

Lublin, dnia 2015-04-29

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Suwińskiej pt. „Udział kalretikulina w procesie wzrostu łagiewki pyłkowej”

Recenzowana rozprawa doktorska została zrealizowana na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Marty Lenartowskiej oraz przy udziale promotora pomocniczego dr Roberta Lenartowskiego.

Rozprawa posiada układ typowy dla prac doktorskich; na 124 stronach pracy wydzielono 7 głównych rozdziałów oraz wykaz najważniejszych skrótów i streszczenie. Dokumentację fotograficzną zawarto na 18 barwnych i czarnobiałych tablicach.

W rozdziale „Wprowadzenie” Doktorantka przedstawia przegląd najnowszej literatury z zakresu rozwoju męskiego gametofitu, tworzenia i organizacji cytologicznej łagiewki pyłkowej. Wiele uwagi poświęca organizacji aktywnego cytoszkieletu oraz roli wapnia w łagiewce pyłkowej. W komórce roślinnej jony wapnia pełnią rolę uniwersalnego przekaźnika informacji, który jest zaangażowany między innymi w regulację wzrostu łagiewki pyłkowej.

Za regulację homeostazy jonów wapnia w łagiewce pyłkowej odpowiedzialne jest białko kalretikulina (CRT), które jest zdolne do wiązania i magazynowania dużej ilości jonów wapnia. Precyzyjna regulacja poziomu jonów wapnia w cytoplazmie warunkuje szczytowy wzrost łagiewki pyłkowej. Kalretikulina uczestniczy także w wielu procesach komórkowych, począwszy od regulacji ekspresji genów, udziału w adhezji komórkowej, w apoptozie i w regulacji aktywności ATPazy. Dzięki swojej unikalnej budowie i specyficznym właściwościom jest białkiem opiekuńczym występującym w retikulum endoplazmatycznym i strukturach Golgiego. Odgrywa istotną rolę w systemie kontroli jakości przeprowadzając selekcję nieprawidłowo sfałdowanych peptydów i glikoprotein. Dotychczas udokumentowano występowanie tego białka między innymi w ziarnach pyłku wielu gatunków roślin kwiatowych,

w komórkach plemnikowych kukurydzy, podczas mikrosporogenezy u tytoniu oraz w procesie rozwoju zarodka. Natomiast nie jest jednoznacznie wyjaśniona rola roślinnej CRT w rozwoju łagiewki pyłkowej i tego zadania podjęła się Doktorantka w niniejszej pracy. Wyniki badań prowadzonych w ośrodku toruńskim wskazują, że CRT z uwagi na zdolność do wiązania i buforowania jonów wapnia, może być zaangażowana w utrzymanie homeostazy Ca^{2+} w rosnącej łagiewce pyłkowej. Wybór łagiewki pyłkowej jako modelu badawczego jest bardzo cenny także dla wiedzy embriologicznej, ponieważ to właśnie ta struktura odpowiada za aktywny transport komórek plemnikowych do woreczka zalążkowego, a zatem uczestniczy w płciowym zapłodnieniu. Łagiewka pyłkowa charakteryzuje się bardzo szybkim wzrostem, a więc również odznacza się wysoką aktywnością metaboliczną.

Badania prowadzono na *Petunia hybrida*, gatunek ten uznawany jest za roślinę modelową do badań fizjologicznych i embriologicznych. Poza tym w ośrodku toruńskim już od kilkunastu lat prowadzi się badania na tej roślinie, co pozwoliło Doktorantce na korzystanie z warsztatu badawczego oraz głębokiej wiedzy i doświadczenia toruńskiego zespołu. Całoroczna uprawa roślin w szklarni zapewniała obfitość materiału badawczego.

Przedstawione w rozprawie badania obejmowały: poznanie morfologii i ultrastruktury łagiewki pyłkowej, określenie miejsc syntezy i lokalizacji CRT oraz ustalenie ekspresji genu *CRT* odpowiedzialnego za syntezę tego białka. Do realizacji postawionych zadań badawczych zastosowano nowoczesne metody cytologiczne, immunocytochemiczne, technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) analizę Western Blot oraz technikę wyciszania ekspresji genu za pomocą interferencji RNA. W rozdziale Materiał i Metody uzasadniono wybór gatunku badawczego i opisano szczegółowo metody stosowane przez Doktorantkę podczas wykonywania poszczególnych etapów badań. Dzięki zastosowaniu precyzyjnych metod immunocytochemicznych zlokalizowano CRT w rosnących łagiewkach pyłkowych. W kielkujących ziarnach pyłkowych transkrypty *PhCRT* zlokalizowano we wszystkich aperturach, przy czym najwyższy poziom sygnału hybrydyzacji występował w cytoplazmie aktywnej apertury. Badania w TEM wykazały, że u petunii występuje typowa strefowa organizacja cytoplazmy łagiewki pyłkowej z dużym nagromadzeniem ER, diktiosomów i mitochondriów w regionie subapikalnym. Poza tym potwierdzono, że u petunii obserwuje się dwukierunkową orientację filamentów aktynowych w strefie trzonowej łagiewek pyłkowych, co umożliwia przepływ cytoplazmy zgodnie z modelem „odwrotnej fontanny”.

Wszystkie opisane w rozprawie wyniki zostały prawidłowo przedstawione i poparte dokumentacją fotograficzną bardzo dobrej jakości, która została zawarta na 18 tablicach.

Przedmiotem analizy były ziarna pyłkowe i kielkujące łagiewki pyłkowe w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Przedstawiono morfologię i ultrastrukturę ziaren i łagiewek pyłkowych petunii, przeanalizowano organizację cytoszkieletu aktynowego, zlokalizowano badane białko - kalretikulinę. Przedstawione eksperymenty były zawsze porównywane w reakcjach kontrolnych. Hodowane w warunkach *in vitro* łagiewki pyłkowe nie wykazywały cytologicznych zmian w porównaniu do łagiewek rosnących w szyjce słupka (*in planta*). Podjęte badania mające na celu poszukiwanie miejsc występowania białka CRT i jego transkryptów wykazały, że miejscem tym są aktywne apertury w uwodnionych i kielkujących ziarnach pyłkowych. Należy podkreślić, że w eksperymentach wykorzystano sondę molekularną opracowaną i zsyntetyzowaną na potrzebę niniejszych badań. Są to zatem badania pionierskie, co znacznie podnosi rangę uzyskanych wyników.

Interesującym efektem badań było udokumentowanie występowania delikatnej sieci krótkich mikrofilamentów w cytoplazmie apikalnej strefy rosnącej łagiewki pyłkowej. Niewiele jest prac z tego zakresu, poza tym przedstawiane hipotezy są niejednoznaczne. Niektóre negują obecność MFs w apikalnej strefie łagiewki, inne zaś potwierdzają ich obecność oraz wskazują na dynamiczny charakter MFs i ich zaangażowanie w ruch pęcherzyków wydzielniczych. W pracy udowodniono, że MFs mogły być zlokalizowane wokół MGU, co świadczyłoby o zaangażowaniu cytoszkieletu aktynowego w transporcie jądra generatywnego do rosnącego wierzchołka łagiewki pyłkowej. Mam nadzieję, że w dalszych swoich badaniach Doktorantka poświęci więcej uwagi temu ciekawemu zagadnieniu.

Dyskusja zawiera ogólne podsumowanie uzyskanych rezultatów w kontekście aktualnego stanu wiedzy. Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych oraz danych literaturowych Doktorantka udowodniła tezę, że w kielkujących ziarnach pyłku *P. hybrida* synteza białka kalretikulina zachodzi na powierzchni szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Natomiast transkrypty *PhCRT* były obecne w jądrze wegetatywnym oraz w krótkich łagiewkach pyłkowych. Zastosowanie eksperymentów z wyciszeniem ekspresji genu *PhCRT* wykazało, że CRT jest jednym z kluczowych elementów molekularnych kontrolujących szczytowy wzrost łagiewki pyłkowej u petunii. Uzyskane wyniki potwierdziły, że do prawidłowego wzrostu łagiewki pyłkowej niezbędna jest obecność białka kalretikulina, a jego brak skutkuje zaburzeniami podstawowych procesów komórkowych. Obserwowano zaburzenia morfologiczne, cytologiczne m.in. destrukcję cytoszkieletu aktynowego oraz redukcję i nietypową lokalizację cystern ER. Po zgromadzeniu wielu wyników Doktorantka stawia w pełni uzasadnione, logiczne pytanie w jaki sposób CRT reguluje polarny wzrost łagiewki pyłkowej. Na podstawie

przedstawionych w rozprawie wyników udowadnia, że badane białko kalretikulina wykazuje zdolność do buforowania poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie łagiewki pyłkowej. Precyzyjna regulacja homeostazy Ca^{2+} jest niezbędna dla właściwej organizacji cytoszkieletu aktynowego, który odpowiada za rozmieszczenie organeli komórkowych oraz egzo- i endocytarnych pęcherzyków w spolaryzowanej cytoplazmie łagiewki. W końcowych wnioskach Autorka zaproponowała hipotetyczny model funkcjonowania CRT w rosnącej łagiewce pyłkowej.

Przeprowadzona przez mgr Suwińską seria doświadczeń pozwoliła na przekonujące wsparcie postawionej na początku hipotezy. Wyniki uzyskiwane w kolejnych etapach prac badawczych są wyczerpujące i imponują wszechstronnością i nowoczesnością stosowanych metod. Świadczą o tym, że Doktorantka znakomicie opanowała warsztat naukowy i wykazała się bogatą wiedzą w zakresie biologii molekularnej, biochemii i genetyki a także umiejętnością interpretowania uzyskanych rezultatów. Ponadto wszelkie wyniki były porównane z materiałem kontrolnym, co świadczy o rzetelności przeprowadzanych doświadczeń. Bogata dokumentacja fotograficzna pozwala na stwierdzenie, że eksperymenty były przeprowadzone w sposób poprawny pod względem stosowanych metod, oraz że uzyskane wyniki były prawidłowo interpretowane.

Z obowiązku recenzenta chciałam zawrócić uwagę na kilka drobnych niedociągnięć zauważonych przeze mnie w recenzowanej pracy. Największym mankamentem było zmniejszenie rozmiarów tablic fotograficznych do formatu, który utrudniał zaobserwowanie szczegółów opisywanych w rozprawie. Jest to tym bardziej nieuzasadnione, że cała dokumentacja fotograficzna była doskonałej jakości, ponadto znaczna część strony pozostała pusta. Z innych drobnych uwag redakcyjnych: zbyt częste używanie terminu „ujawniono”, nieprawidłowy termin: „cięcie optyczne” zamiast np. płaszczyzna przekroju, „suchy pyłek” zamiast odwodniony. Na tablicy numer 2 - opis do fotografii (h-j) niepoprawny, natomiast na fotografii 2e – nie widać mikrofilamentów, o których jest mowa w opisie; także fotografia 14a` nie przedstawia czerwonej fluorescencji chloroplastów.

Wymienione w recenzji uwagi nie wpływają jednak na zasadniczą, wysoce pozytywną ocenę przedstawionej pracy doktorskiej. Potwierdzeniem wartości naukowej zawartych w niniejszej rozprawie badań są publikacje w renomowanych czasopismach *Planta*, w której Doktorantka jest pierwszym autorem oraz *Plant Cell Research*, w której jest współautorem.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Anny Suwińskiej zatytułowana „Udział kalretikulina w procesie wzrostu łagiewki pyłkowej” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia z nawiązką wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o

stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), w brzmieniu ustalonym Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz. 455) i może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Anny Suwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze dużą wartość poznawczą uzyskanych przez Doktorantkę wyników, wnioskuję o nagrodzenie niniejszej dysertacji stosowną nagrodą.

Krzysztof Winiarczyk